

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
11 DE 39 19915 A 1

51 Int. Cl. 5:  
C 07 D 207/452

21 Aktenzeichen: P 39 19 915.0  
22 Anmeldetag: 19. 6. 89  
43 Offenlegungstag: 20. 12. 90

DE 39 19915 A 1

71 Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

72 Erfinder:  
Huber, Erasmus, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 8046 Garching, DE; Klein, Christian, Dipl.-Chem. Dr., 8120 Weilheim, DE; Batz, Hans-Georg, Dr.rer.nat., 8132 Tutzing, DE; Zink, Bruno, 8114 Uffing, DE

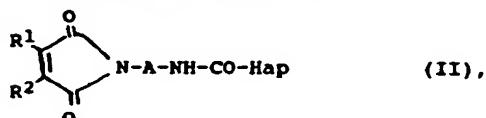
54 Aminoalkylmaleimide und davon abgeleitete Hapten- und Antigenderivate sowie Konjugate mit Peptiden oder Proteinen

Die Erfindung betrifft neue Aminoalkylmaleimide der allgemeinen Formel I



in der R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylgruppe darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte Alkylkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, sowie deren entsprechenden Säureadditionssalze, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminohexylmaleimid.

Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die aus Verbindungen der allgemeinen Formel I und immunologischen Bindungspartner gebildeten Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II



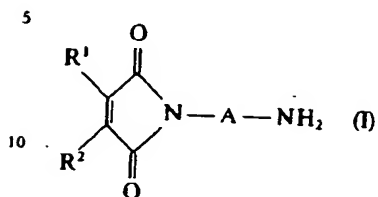
in der R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> und A die oben angegebenen Bedeutungen haben und Hap, der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen oder deren reaktive Derivate tragenden Hapten oder Antigen durch Amidierung gebildete Rest ist.

Außerdem betrifft die Erfindung immunologische Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden oder Proteinen hergestellt werden können. Diese Konjugate werden im folgenden synonym als Hapten-Peptid bzw. Hapten-Protein-Konjugate bezeichnet. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und II sowie der Peptid- und Protein-Konjugate, sowie die Verwendung dieser Konjugate in diagnostischen Bestimmungsmethoden, insbesondere in Immunoassays.

DE 39 19915 A 1

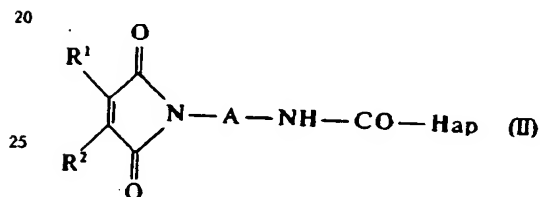
## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Aminoalkylmaleimide der allgemeinen Formel I



in der  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine  $\text{C}_1 - \text{C}_4$ -Alkylgruppe darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte Alkylkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, sowie deren entsprechenden Säureadditionssalze, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminoethylmaleimid.

Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die aus Verbindungen der allgemeinen Formel I und immunologischen Bindungspartner gebildeten Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II



in der  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  und A die oben angegebenen Bedeutungen haben und Hap, der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen oder deren reaktive Derivate tragenden Hapten oder Antigen durch Amidierung gebildete Rest ist.

Außerdem betrifft die Erfindung immunologische Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden oder Proteinen hergestellt werden können. Diese Konjugate werden im folgenden synonym als Hapten-Peptid bzw. Hapten-Protein-Konjugate bezeichnet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und II sowie der Peptid- und Protein-Konjugate, sowie die Verwendung dieser Konjugate in diagnostischen Bestimmungsmethoden, insbesondere in Immunoassays.

In vielen biochemischen Techniken ist die Verknüpfung von zwei sich funktional unterscheidenden Komponenten bzw. Verbindungen von grundlegender Bedeutung. So werden beispielsweise auf dem Gebiet der Affinitätschromatographie an eine feste unlösliche Trägermatrix verschiedenartige Liganden gebunden. Diese Liganden sind in der Lage, die in einer Probe enthaltenen und für diesen betreffenden Liganden spezifischen Substanzen zu erkennen und zu binden. Dadurch ist eine gezielte Abtrennung der in der Probe enthaltenen Verbindungen möglich. Als Liganden kommen beispielsweise Antikörper oder Enzyme in Frage, die ein Antigen oder ein Substrat spezifisch binden.

Zur Verknüpfung von Komponenten im obigen Sinne werden häufig bifunktionelle Reagenzien, die auch als Linker bezeichnet werden, eingesetzt. Diese enthalten in der Regel zwei chemisch reaktive Gruppen, die mit bestimmten Resten der miteinander zu verknüpfenden Komponenten möglichst spezifisch reagieren. Generell unterscheidet man hierbei zwischen hetero-bifunktionellen Reagenzien einerseits, wie z. B. gamma-Maleimidobuttersäure-N-hydroxysuccinimid, und homo-bifunktionellen Reagenzien andererseits, wie z. B. N,N'-Bis-(3-maleimidopropionyl)-2-hydroxy-1,3-propandiamin. Die heterobifunktionellen Reagenzien besitzen zwei chemisch unterschiedliche reaktive Gruppen, wie beispielsweise im obigen Fall die Maleimido- und die N-Hydroxy-succinimido-Gruppe. Während die Maleimidogruppe sehr spezifisch mit sulfhydrylhaltigen Verbindungen reagiert, eignet sich die Hydroxysuccinimidogruppe bevorzugt zur Reaktion mit Verbindungen, die eine Aminogruppe enthalten. Auf diese Weise lassen sich auf elegante Art und Weise zwei Komponenten bzw. Verbindungen miteinander verknüpfen, wobei die eine beispielsweise eine Sulfhydrylgruppe enthält und die andere eine Aminogruppe. In analoger Weise dienen die homobifunktionellen Reagenzien, die zwei chemisch gleichartige reaktive Gruppen enthalten, zur Verknüpfung von Komponenten mit identischen funktionellen Gruppen, wie beispielsweise im obigen Fall von Sulfhydrylgruppen.

Je nach Eigenschaft der miteinander zu verknüpfenden Komponenten kommen demnach eine Reihe von solchen bifunktionellen Reagenzien zum Einsatz (Kia-ki Han et al., Int. J. Biochem. 16 (2), 129 - 145 (1984) und R.E. Feeney, Int. J. Peptide Protein Res. 29, 1987, 145 - 161). So ist beispielsweise in Arch. Biochem. Biophys. 203, 774 (1980) die Verwendung von N-6-Aminoethylmaleimid zur Herstellung einer modifizierten Agarose-Festphase für die Affinitätschromatographie beschrieben.

Ein weiteres Anwendungsgebiet bifunktioneller Reagenzien ist die Herstellung von Reagenzien für die klinische Diagnostik. Hierbei werden in zunehmendem Maße Bestimmungsverfahren nach dem Prinzip der Immunoassays durchgeführt, die sich durch besonders hohe Empfindlichkeit auszeichnen. Dabei werden oft Konjugate z. B. aus einem Markierungsenzym und einer zu bestimmenden Substanz, dem sogenannten Analyten, bzw. einer einen Antikörper bindefähigen Substanz, dem sogenannten Antigen, eingesetzt. Diese Konjugate

lassen sich vorzugsweise durch den Einsatz von bifunktionellen Reagenzien herstellen.

Ein weiteres Beispiel aus jüngster Zeit ist die auf dem Gebiet der homogenen Immunoassays immer mehr an Bedeutung gewinnende sogenannte CEDIA-Technik (Clinical Chemistry 32/9, 1637 – 1641 (1986); US-47 08 929). Bei dieser diagnostischen Bestimmungsmethode wird ebenfalls von dem Prinzip der Verknüpfung von zwei Verbindungen Gebrauch gemacht. Dabei wird ein Analyt, der im allgemeinen ein Hapten oder ein Antigen sein kann, an eine enzymatisch inaktive Vorläuferstufe des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase angeknüpft. Diese inaktive Vorläuferstufe ist ein Peptid und wird in der oben zitierten Literatur auch als Enzymdonor bezeichnet.

Die Durchführung dieses Tests beruht auf folgendem Prinzip: Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase besteht aus 4 Untereinheiten, die wiederum aus einer größeren Polypeptidkette, die auch als Enzymakzeptor EA bezeichnet wird, und einer kleineren Peptidkette, Enzymdonor ED genannt, aufgebaut ist. Enzymakzeptor und Enzymdonor sind beide enzymatisch inaktiv, können sich aber spontan zu einem aktiven Tetramer zusammenlagern. Aufgrund der außerordentlich geringen Dissoziationskonstanten des aus Enzymdonor und Enzymakzeptor gebildeten aktiven Enzyms ist die Menge des gebildeten Enzyms direkt proportional zur Menge des vorhandenen Enzymdonors bzw. -akzeptors. Bei der Durchführung von Immunoassays macht man sich die Eigenschaft nun dadurch zu Nutzen, in dem man anstelle des natürlichen Enzymdonors einen chemisch modifizierten Enzymdonor einsetzt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, daß ein Analyt oder Immunogen kovalent an funktionelle Gruppen des als Enzymdonor fungierenden Peptids geknüpft ist. Als Immunogen kommen beispielsweise Haptene oder Antigene in Frage.

Bei der Durchführung der immunologischen Bestimmungsmethode ist im Testsystem außerdem ein das entsprechende Immunogen erkennender Antikörper in einer Menge vorhanden, der die spontane Assoziation des Enzymdonors und des Enzymakzeptors zum aktiven Enzym verhindert.

Die Reaktion zur Bestimmung der Konzentration eines dem Immunogen entsprechenden Analyten wird nun derart durchgeführt, daß eine gewisse Menge der zu bestimmenden Probe zu dem oben beschriebenen Testsystem zugefügt wird. Da es sich bei diesem Reaktionstyp um einen kompetitiven Test handelt, binden die vorhandenen Antikörper, die gegen den Analyten oder das Hapten gerichtet sind, sowohl die aus der Probe kommenden freien Antigene oder Haptene, sowie einen Teil der mit dem Antigen oder Hapten markierten Enzymdonatoren. Der durch die Verdrängungsreaktion durch das freie Antigen ausgelöste freie Anteil des markierten Enzymdonors assoziiert dann spontan mit dem Enzymakzeptor zum enzymatisch aktiven Tetramer, dessen Konzentration direkt proportional zu der Konzentration des aus der Probe stammenden Analyten (Antigen) oder Haptens ist. Die Menge des durch diese spontane Assoziation gebildeten Enzyms  $\beta$ -Galactosidase wird durch Hydrolyse eines geeigneten Enzymsubstrates, beispielsweise von o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid oder Chlorphenolrot- $\beta$ -D-galactopyranosid und Freisetzung des entsprechenden Chromophors gemessen.

Bei der oben dargestellten erforderlichen Verknüpfung zwischen Immunogen (Analyt) und Enzymdonor besteht das Problem, daß die Modifizierung des Enzymdonors nur an solchen Stellen im Molekül erfolgen darf, die für die Erkennung zwischen Enzymdonor und Enzymakzeptor nicht von Bedeutung sind. Ansonsten wäre die Assoziation zum enzymatisch aktiven Enzymkomplex gestört und der gemessene Wert für das zu bestimmende Hapten würde ein falsches Ergebnis vortäuschen.

Es ist literaturbekannt, daß zur Herstellung der Hapten-Enzymdonor-Konjugate beispielsweise Maleimidylbenzcarbamyldigoxigenin als Linker eingesetzt werden kann (Clin.Chem. 32, 1637 (1986)). Die Bindung dieses Haptens an den Enzymdonor erfolgt durch Umsetzung von Digoxigenin, das als Hapten fungiert, mit 3-Maleimidobenzoesäure. Die Verknüpfung seitens des Enzymdonors mit dem oben gebildeten Digoxigenin-Derivate erfolgt durch Reaktion einer Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein am Enzymdonor mit der Maleimidogruppe.

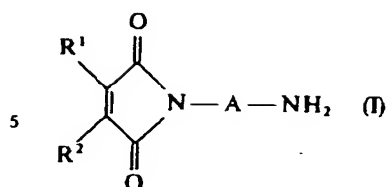
Das in dem oben genannten Fall eingesetzte bifunktionelle Reagens hat jedoch den Nachteil, daß einerseits die vorhandene Urethan-Bindung hydrolyseempfindlich ist und das Reagenz somit nicht hinreichend stabil genug ist, und daß ferner durch den vorhandenen Benzcarbamyrest ein Teil der Bindungsaktivität der Antikörper gegen den Linker selbst, d. h. gegen das Brückenmolekül zwischen Hapten und Enzymdonor im Immunogen gerichtet ist. Dies bedeutet, daß bei der Antigen-Antikörper-Reaktion häufig mit Kreuzreaktivitäten zu rechnen ist, die im immunologischen Test zu Problemen führen.

Es bestand daher die Aufgabe, solche bifunktionellen Reagenzien zu finden, die sich für die Verknüpfung zwischen Hapten einerseits und Enzymdonor andererseits eignen, wobei die mit Hilfe dieser Linker hergestellten Hapten-Peptid-Konjugate eine möglichst geringe Kreuzreaktivität gegen das Brückenmolekül selbst aufweisen sollen.

Außerdem sollten diese bifunktionellen Reagenzien möglichst stabil und einfach herstellbar sein. Ferner sollen sie mit Haptenen unter chemisch milden Bedingungen reagieren, damit die zur Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern als Immunogene erforderlichen Haptenderivate auf schonende und einfache Weise hergestellt werden können.

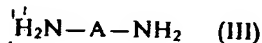
Diese Aufgaben werden mit der vorliegenden Erfindung gelöst. Insbesondere hat sich gezeigt, daß die zwischen den Maleimidgruppe und der Aminogruppe sich befindende Alkylgruppe A eine geringere Kreuzreaktivität verursacht als bei den aus dem Stand der Technik bekannten Hapten-Peptid-Konjugaten. Dies trifft insbesondere für die geradkettigen Derivate mit  $n=2-4$  zu.

Gegenstand der Erfindung sind die neuen Verbindungen der allgemeinen Formel I

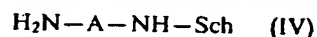


10 in denen  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  ein Wasserstoffatom oder  $\text{C}_1$ – $\text{C}_4$ -Alkylgruppen, insbesondere den Methyl-, Ethyl- oder Isopropylrest darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte Alkylengruppe mit 2–6 C-Atomen, insbesondere mit 2–4 C-Atomen darstellen, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminohexylmaleimid. Besonders bevorzugt sind Verbindungen, in denen A die Ethylengruppe bedeutet, oder  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  ein Wasserstoffatom darstellen.

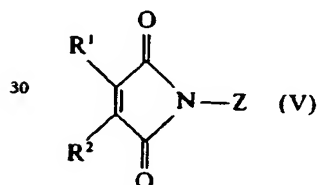
15 Diese Verbindungen können beispielsweise dadurch hergestellt werden, indem ein Diamin der allgemeinen Formel III



20 in der A die oben angegebene Bedeutung hat, in eine Verbindung der allgemeinen Formel IV



überführt wird, wobei Sch eine für die Aminogruppe geeignete leicht abspaltbare Schutzgruppe, beispielsweise die tert-Butyloxycarbonylgruppe darstellt, und anschließend die Verbindung der allgemeinen Formel IV mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V



35 in der  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  die oben angegebenen Bedeutungen haben und Z eine reaktive Gruppe bedeutet, nach an sich bekannten Verfahren umsetzt, und anschließend die Schutzgruppe Sch wieder abspaltet.

Die Umsetzung der Diamine der allgemeinen Formel III mit geeigneten Schutzgruppenreagenzien, wie z. B. Di-tert-butyl-dicarbonat, tert-Butoxycarbonylchlorid oder N-(tert-Butoxy-carbonyloxy)phthalimid, erfolgt in Lösungsmittel, wie z. B. Dioxan, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid oder Ethanol bei Temperaturen von  $-20^\circ\text{C}$  bis  $+100^\circ\text{C}$ , vorzugsweise bei  $0^\circ\text{C}$  bis  $+25^\circ\text{C}$  nach an sich bekannten Methoden.

Die Umsetzung der Verbindungen der Formel IV mit Verbindungen der Formel V werden sind vorzugsweise in basischen Lösungen bei Temperaturen von  $-20^\circ\text{C}$  bis  $+80^\circ\text{C}$  durchgeführt. Als reaktive Gruppe Z kommen solche in Frage, die sich leicht abspalten lassen, beispielsweise die Ethoxycarbonylgruppe.

45 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel II, in der Hap repräsentativ für einen Bindungspartner steht, der sich als Analyt zum Einsatz bei immunologischen Bestimmungsverfahren eignet. Solche Bindungspartner sind beispielsweise Haptene oder Antigene, die mindestens eine Carboxylgruppe tragen, wie z. B. Cortisol, Theophyllin, Digoxigenin als Haptene, oder Proteine oder Peptide als Antigene. Es kommen jedoch prinzipiell für die Gruppe Hap alle solche Gruppen in Frage, die sich als Immunogene zur Durchführung von Bestimmungsmethoden nach der oben beschriebenen CEDIA-Technik eignen. Diese Immunogene können insbesondere Analyte sein, d. h. solche Verbindungen, die im Serum von Patienten vorkommen und deren Bestimmung von diagnostischem Interesse ist.

50 Zur Herstellung der Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II kommen die oben unter Hap definierten Verbindungen in Frage. Für die Umsetzung der Maleimide der allgemeinen Formel I mit geeigneten Hap-Derivaten ist es zweckmäßig, die in Hap vorhandene Carboxylgruppe zunächst durch Überführung in ein reaktives Derivat zu aktivieren. Dies geschieht beispielsweise durch Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimidester in Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie z. B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid. Der auf diese Weise hergestellte Hap-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester wird dann direkt mit dem Maleimidderivat der allgemeinen Formel I in hoher Ausbeute zu den entsprechenden Maleimid-Hapten-Derivaten der allgemeinen Formel II umgesetzt. Es ist jedoch prinzipiell auch möglich, andere Aktivierungsgruppen der Carboxylgruppe zu verwenden, wie z. B. die Imidazolyl-, Hydroxybenzotriazolyl-, p-Nitrophenyl- oder Isobutoxycarbonylgruppen.

60 In bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel II ist der immunologische Bindungspartner ein Hapten, wie z. B. ein Steroidhormon oder ein Xanthinderivat, beispielsweise Cortisol, Theophyllin oder Digoxigenin. Prinzipiell können jedoch alle diejenigen Haptene eingesetzt werden, die eine reaktive Carboxylgruppe tragen. Es ist jedoch auch denkbar, daß solche Bindungspartner eingesetzt werden, die ursprünglich keine freie Carboxylgruppe aufweisen, wenn durch chemische Modifizierung die entsprechende Carboxylgruppe nachträglich in das Hapten eingeführt wird.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Verbindungen der allgemeinen Formel II zur

Verfügung gestellt, in denen das Hapten ein Steroidhormon ist. Der Nachweis von Steroidhormonen, wie z. B. Östrogen, Testosteron, Cortisonen und Herzglucosiden, denen alle das Steroidgrundgerüst gemeinsam ist, spielt in der Diagnostik eine bedeutende Rolle. Die Zurverfügungstellung von Antikörpern gegen Steroidhormone bzw. gegen die entsprechenden Hapten-Peptid-Konjugate für die Durchführung von Immunoassays ist daher wünschenswert.

Es hat sich erwiesen, daß durch die Derivatisierung der Haptene zu den Verbindungen der allgemeinen Formel II das Epitop des Haptens nicht beeinträchtigt wird, so daß ein gegen das jeweilige in der zu bestimmenden Probe vorhandene freie Hapten gerichteter Antikörper auch das entsprechend modifizierte Hapten-Peptid-Konjugat in gleichem Maße erkennt.

Ebenso hat sich gezeigt, daß die derivatisierten Hapten-Peptid-Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der Formel II mit Sulfhydrylgruppenhaltigen Peptiden oder Proteinen erhalten werden, ohne weitere Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften mit dem Enzymakzeptor EA zu den Tetramer-Komplexen der  $\beta$ -Galactosidase assoziieren. Diese wiederum zeigen durch die im Prinzip vorhandene Derivatisierung des Enzyms keine nachteilige Beeinflussung der enzymatischen Aktivität, und spalten die in Frage kommenden Substrate in gleicher Weise wie die unmodifizierte  $\beta$ -Galactosidase.

Bei der Verwendung für die Immunisierung werden die Hap-Derivate der allgemeinen Formel II eingesetzt. Das Haptenderivat wird in den zur Antikörperbildung geeigneten Organismus in Abständen mehrmals injiziert. Es kommt dabei zur Bildung von Antikörpern, die in sehr hohem Prozentsatz nun gegen das Hapten gerichtet sind, und keine Kreuzreaktivität mit den Verknüpfungsgruppierungen aufweisen. Die Antikörper werden dann in an sich bekannter Weise aus dem Organismus isoliert und gereinigt. Die erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II eignen sich sowohl zur Immunisierung für die Herstellung polyklonaler Antikörper als auch zur Herstellung monoklonaler Antikörper.

Überraschenderweise gelingt es durch Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II, Antikörper zu erhalten, die sehr wenig Kreuzreaktivität mit der Brückenverbindung aufweisen. Die erhaltenen Antikörper haben eine hohe Affinität zu dem Hapten. Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate zur Immunisierung werden hohe Antikörpertiter erhalten. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugate besonders gut geeignet zum Einsatz in Immunoassays. Da die Antikörper zu dem Brückenmolekül keine oder eine nur sehr geringe Affinität aufweisen und daher das Hapten sehr spezifisch binden, erhält man mit diesen Konjugaten bei der Verwendung in Immunoassays sehr genaue Ergebnisse.

Die erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II besitzen den Vorteil, daß sie einerseits die Struktur des freien Haptens weitgehend unverändert beinhalten, andererseits im Vergleich zu Derivaten, die z. B. aus dem Stand der Technik bekannt sind, im Brückenmolekül eine charakteristische Änderung aufweisen. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate ermöglicht deshalb die Durchführung heterologer Linker-Techniken auf einfache und effektive Weise.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Konjugate, die durch Umsetzung der Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden und Proteinen hergestellt werden können. Als Peptide und Proteine kommen vorzugsweise solche in Frage, die eine Sulfhydrylgruppe bzw. eine Cysteingruppe enthalten, die mit der Maleimidogruppe der Verbindungen der Formel II reagieren. Die Herstellung solcher Derivate erfolgt nach an sich bekannten Methoden der chemischen Modifizierung von Proteinen. Vorzugsweise werden jedoch Peptide, insbesondere die in der oben beschriebenen CEDIA-Technik verwendbaren Enzymdonatoren ED eingesetzt. Die Herstellung verschiedener ED-Derivate ist aus US 47 08 929 bzw. Clin. Chem. 32 (9), 1986, 1637 – 1641 bekannt, bzw. sind bei Microgenics Corp., Concord, California (USA) erhältlich.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugates bei der Durchführung von Immunoassays.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung anhand von konkreten Ausführungsbeispielen:

#### Beispiel 1

##### 2-(N-Maleinimido)ethylamin

12 g (0,2 mol) Ethylendiamin werden in 200 ml Dioxan/Wasser (50/50 v/v) gelöst. Innerhalb von 1,5 h wird unter Rühren und Kühlung im Eisbad eine Lösung von 21,8 g (0,1 mol) Di-tert.-butyl-dicarbonat in 100 ml Dioxan zugetropft. Man läßt 1 h bei Raumtemperatur weiterrühren, dann wird mit 500 ml Wasser verdünnt und mit 1 l Essigester extrahiert. Die organische Lösung wäscht man dreimal mit je 200 ml Wasser und extrahiert mit zweimal je 300 ml 0,1 n HCl. Die vereinigten HCl-Phasen werden mit 2 n NaOH auf pH 10,0 gestellt und mit 600 ml Essigester extrahiert. Die organische Lösung wird nochmals mit 300 ml Wasser gewaschen, mit 20 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingedampft.

Ausbeute: 1,35 g zähes Öl (entspr. 8,4% d.Th. bez. auf Di-tert.-butyl-dicarbonat).

DC: Kieselgel, Methanol/Essigester (66/33 v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt);  $R_f = 0,14$ .

#### Beispiel 2

##### N-(Tert-butyloxycarbonyl)-2-(N-maleinimido)ethylamin

0,8 g (5 mmol) 2-(N-Maleinimido)ethylamin löst man in 25 ml gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung. Die Lösung wird über ein Faltenfilter filtriert und auf 0°C gekühlt. Anschließend gibt man unter Rühren 0,84 g (5 mmol) N-(Ethoxycarbonyl)maleinimid (hergestellt nach der Methode von O. Keller und J. Rudinger,

Helv.Chim.Acta 58 (1975), 531 – 541) zu und läßt 15 min bei Raumtemperaturiterrühren. Hierbei löst sich das N-(Ethoxycarbonyl)maleinimid nach kurzer Zeit vollständig auf, während die Titelverbindung im Verlauf der Umsetzung ausfällt. Es werden 40 ml THF zugegeben und 45 min bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach stellt man mit 1 n HCl auf pH 6.0, extrahiert mit zweimal je 50 ml Essigester und trocknet den Extrakt mit 5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nach Eindampfen im Wasserstrahlvakuum wird die Titelverbindung als farbloser, fester Rückstand erhalten.

Ausbeute: 1.1 g (92% d.Th.).

DC: Kieselgel, Chloroform/Essigester (66/33 v/v), Besprühen mit 0.1% KMnO<sub>4</sub>-Lsg.; R<sub>f</sub> = 0.50.

### Beispiel 3

#### 2-(N-Maleinimido)ethylamin-Hydrochlorid

0.96 g (4 mmol) der BOC-Aminoverbindung aus Beispiel 2 werden in 25 ml 2 m HCl in Dioxan gelöst und bei Raumtemperatur stehengelassen. Innerhalb 30–60 min beginnt das Produkt 4 auszufallen. Man läßt 24 h bei Raumtemperatur stehen, dann saugt man das Kristallinat ab, wäscht mit ca. 10 ml Essigester nach und trocknet im Exsikkator über CaCl<sub>2</sub> und Paraffin.

Ausbeute: 0.58 g farbloses, feinkristallines Pulver (82% d.Th.).

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 v/v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); R<sub>f</sub> = 0.22.

C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (176.60):

Berechnet:

C 40.81 H 5.14 N 15.86;

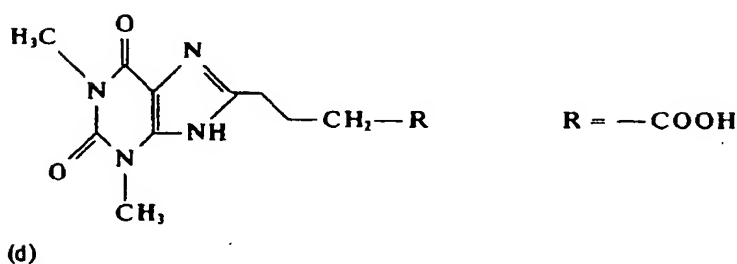
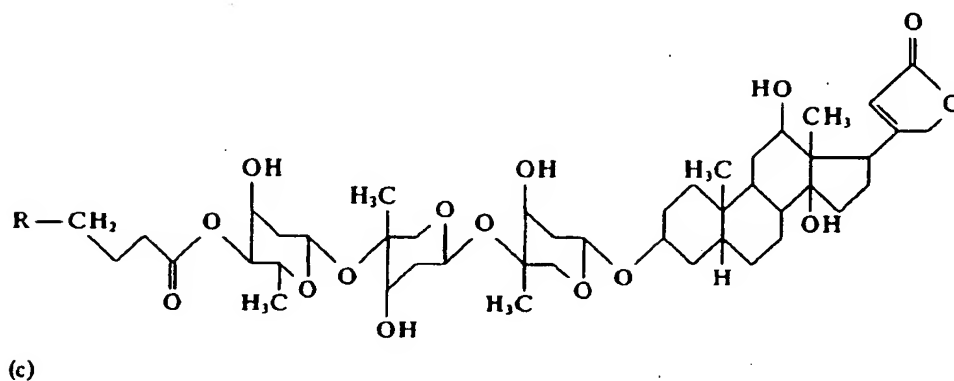
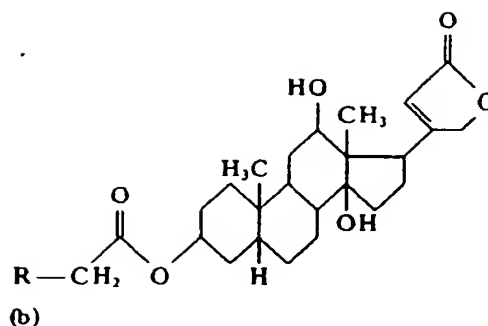
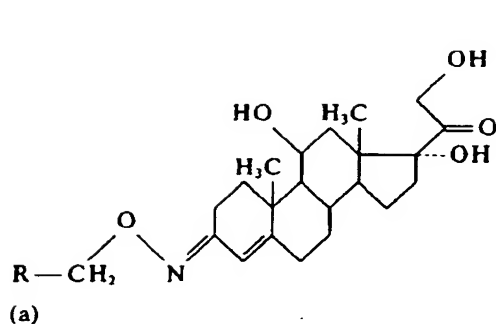
gefunden:

C 40.60 H 5.29 N 15.46;

### Beispiel 4

#### Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester

Aus den Hapten-Carbonsäuren a – d wurden nach Literaturvorschriften die entsprechenden Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester hergestellt:



a: A. Tsuji, M. Smulowitz, J.S.C. Liang und D.K. Fukushima, Steroids 24 (1974) 739–751.

b: G.C. Oliver, B.M. Parker, D.L. Brasfield und C.W. Parker, J. Clin. Invest. 47 (1968) 1035–1042.

c: H.-G. Batz, H.-R. Linke, K. Stellner und G. Weimann, DE-A 25 37 129 bzw. US 41 33 949.

d: C.E. Kuck, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 13 (1976) 497–505.

0.5 mmol der Hapten-Carbonsäure a–d werden zusammen mit 63 mg (0.55 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 10 ml absolutem DMF gelöst und mit 1.13 mg (0.55 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man läßt 4 h bei Raumtemperatur rühren, filtriert und dampft die Lösung im Vakuum ein. Der Rückstand wird in 20 ml THF aufgenommen und eventuell unlösliche Reste an N,N'-Dicyclohexylharnstoff durch Filtration entfernt. Die Lösungen der Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester werden in dieser Form zur nächsten Stufe eingesetzt.

#### Beispiel 5

#### Hapten-Carbonsäure-[2-(N-maleinimido)ethylamide] II a–d

#### Allgemeine Vorschrift

Zur Lösung der aktivierten Haptene aus Beispiel 4 werden 88 mg (0.5 mmol) 2-(N-maleinimido)ethylamin gegeben. Unter Rühren werden 51 mg (0.5 mmol) Triethylamin zugetropft, danach läßt man 6 h bei Raumtemperatur weiterführen. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft und die Hapten-Maleinimid-Verbindung II A–C durch Säulenchromatographie an einer Kieselgel-Säule (2.5 × 30 cm) mit einem geeigneten Lösungsmittel gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und im Vakuum eingedampft.

Die Lösung von Verbindungen II D wird im Vakuum auf die Hälfte eingeeengt und der Niederschlag abfiltriert. Dann wird das Lösungsmittel im Vakuum vollends entfernt. Der Rückstand wird mit Isopropanol digeriert, das feste Produkt abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

C 52.41 H 5.01 N 21.74.

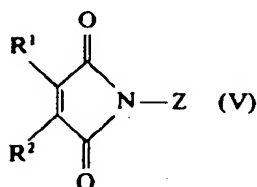


# DE 39 19 915 A1

in der A die oben angegebene Bedeutung hat, in eine Verbindung der allgemeinen Formel IV

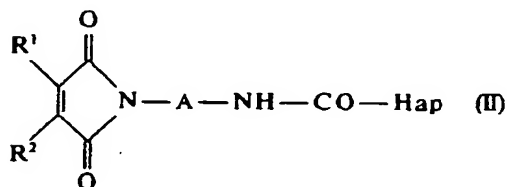


überführt wird, wobei Sch eine für die Aminogruppe geeignete leicht abspaltbare Schutzgruppe, beispielsweise die tert.-Butyloxycarbonylgruppe darstellt, und anschließend die Verbindung der allgemeinen Formel IV mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V



in der R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> die oben angegebenen Bedeutungen haben und Z eine reaktive Gruppe bedeutet, nach an sich bekannten Verfahren umgesetzt, und anschließend die Schutzgruppe Sch wieder abspaltet.

5. Amidoalkyl-maleimide der allgemeinen Formel II



in der Hap der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen oder deren reaktiven Derivate tragenden Hapten oder Antigen durch Amidierung gebildete Rest ist, R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich oder verschieden sind und eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylgruppe oder ein Wasserstoffatom bedeuten, und A eine geradkettige oder verzweigte Alkylengruppe mit 2-6 C-Atomen darstellt.

6. Amidoalkyl-maleimide nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten ein Steroidhormon ist.

7. Amidoalkylmaleimide nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten ein Xanthinderivat ist.

8. Amidoalkylmaleimide nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten Cortisol, Testosteron oder Digoxigenin ist.

9. Amidoalkylmaleimide nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten Theophyllin ist.

10. Verfahren zur Herstellung von Amidoalkylmaleimiden der allgemeinen Formel II nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man ein eine oder mehrere Carboxylgruppen oder deren reaktiven Derivate tragendes Hapten oder Antigen mit einer Verbindung der allgemeinen Formel I, wie in den Ansprüchen 1 bis 3 angegeben, in an sich bekannter Weise umsetzt.

11. Konjugate hergestellt durch Umsetzung von Amidoalkylmaleimiden gemäß einem der Ansprüche 5-9 mit einem eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen tragenden Peptid oder Protein.

12. Konjugate nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid der als ED4 bezeichnete Enzymdonor des Enzyms  $\beta$ -Galactasidase ist.

13. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel II gemäß einem der Ansprüche 5 bis 9 mit einem eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen tragenden Peptid auf an sich bekannte Weise umsetzt.

14. Verwendung von Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 3 zur Herstellung von Verbindungen wie in den Ansprüchen 5 bis 9 angegeben.

15. Verwendung von Verbindungen der Formel II nach einem der Ansprüche 5 bis 9 zur Herstellung von Konjugaten wie in den Ansprüchen 11 oder 12 angegeben.

16. Verwendung von Konjugaten nach den Ansprüchen 11 oder 12 in diagnostischen Bestimmungsverfahren.

17. Diagnostisches Mittel enthaltend Konjugate gemäß Anspruch 11 oder 12 zur Durchführung von immunologischen Bestimmungen.

— Leerseite —